



Ministero dello Sviluppo Economico

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. FI 2004 A 000048

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Si compone di pagg. 36

Roma, li. 17 GEN. 2007

IL FUNZIONARIO

Paola Giuliano

Dr.ssa Paola Giuliano

MARCA DA BOLLO

Ministero dell'Economia e delle Finanze € 43,86

Agenzia Entrate

00028328 000001C1 W08AH001
00022085 17/01/2007 15:41:52
0001-00010 2713AD7F5A583E

0 1 06 012667 730 5

MARCA DA BOLLO

Ministero dell'Economia e delle Finanze € 43,86

Agenzia Entrate

00028328 000001C1 W08AH001
00022082 17/01/2007 15:41:52
0001-00010 C9A48C8E2FD6E630

0 1 06 012667 703 5

MARCA DA BOLLO

Ministero dell'Economia e delle Finanze € 43,86

Agenzia Entrate

00028328 000001C1 W08AH001
00022083 17/01/2007 15:41:59
0001-00010 F496CD985F121CC3

0 1 06 012667 702 4

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°

2004A 000048



A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	A. MENARINI INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.R.L.		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 00395270481
INDIRIZZO COMPLETO	A4	FIRENZE		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2		COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
B. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO	B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1			
INDIRIZZO	B2			
CAP/ LOCALITA'/PROVINCIA	B3			
C. TITOLO	C1	Compositi biomimetici contenenti idrossiapatiti sostituite con magnesio e carbonato e processi per ottenerli.		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	ROVERI Norberto
NAZIONALITA'	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	BIAGINI Graziella
NAZIONALITA'	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	TAMPIERI Anna
NAZIONALITA'	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	TOSETTI Alessandro
NAZIONALITA'	D2	Italiana

E. CLASSE PROPOSTA	SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
	E1	E2	E3	E4	E5

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1	TIPO	F2
NUMERO DOMANDA	F3		F4
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1	TIPO	F2
NUMERO DOMANDA	F3		F4
G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI	G1		

FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I	NOTARE ARTOLO & GERVASI s.p.a. Lino Bertoldi
---------------------------------	--

MODULO A (2/2)

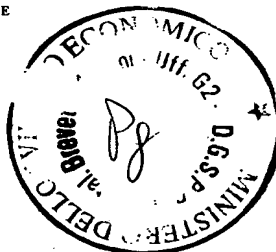
I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI, CONSAPEVOLE/I DELLE SANZIONI PREVISTE DALL'ART.76 DEL D.P.R. 28/12/2000 N.455.

NUMERO ISCRIZIONE ALBO E NOME:	I1	475 BRIGHENTI Livio
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	NOTARBARTOLO & GERVASI S.P.A.
INDIRIZZO	I3	L.NO A. VESPUCCI. 24
CAP/ LOCALITÀ/PROVINCIA	I4	50123 - FIRENZE
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	NESSUNA

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO	N. ES. ALL.	N. ES. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ.	1		26
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE)	1		0806
DESIGNAZIONE D'INVENTORE	0		
DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE IN ITALIANO	0		
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE	0		



LEGGASI: 06

	(SI/NO)
LETTERA D'INCARICO	SI
PROCURA GENERALE	NO
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE	NO

IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE

ATTESTATI DI VERSAMENTO

FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI) DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO? (SI/NO)

Euro	
A	
SI	
NO	

Duecentonovantuno/80=

D	x	F
---	---	---

DATA DI COMPILAZIONE

27/02/04

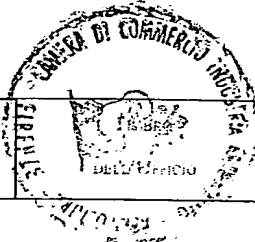
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I

NOTARBARTOLO & GERVASI spa

Lino Brighenti

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	FI 2004A 000048		
C.C.I.A.A. DI	FIRENZE		Cod. 48
IN DATA	27/02/2004	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO	
LA PRESENTE DOMANDA, CORREDATA DI N.	01	FOGLI AGGIUNTIVI, PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRA RIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE			
IL DEPOSITANTE	L'UFFICIALE ROGANTE		



FOGLIO AGGIUNTIVO MODULO A

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE **FI 2004A 000048**

FOGLIO AGGIUNTIVO N.

01

DI TOTALI:

01

A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I

COGNOME E NOME	D1	ALTAMURA Maria
NAZIONALITÀ	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	GOSO Cristina
NAZIONALITÀ	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I	NOTAR BARTOLO & GERVASI spa <i>Antonio Bartolo</i>				

PROSPETTO MODULO A

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA: **FI 2004A 000048**

DATA DI DEPOSITO:

A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO ;

A. MENARINI INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.R.L. - FIRENZE - ITALIA

C. TITOLO

Compositi biomimetici contenenti idrossiapatiti sostituite con magnesio e carbonato e processi per ottenerli.

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

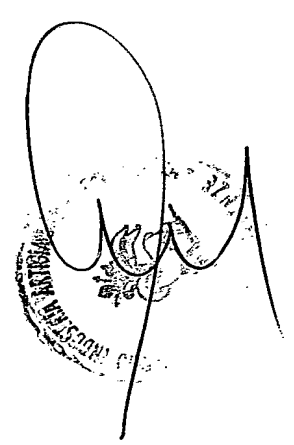
SOTTOGRUPPO

E. CLASSE PROPOSTA

O. RIASSUNTO

Sono descritte idrossiapatite carbonatate e contenenti magnesio, materiali compositi costituiti da dette idrossiapatiti e da polimeri polisaccaridici naturali; sono inoltre descritti processi per la preparazione di detti prodotti ed il loro uso in campo ortopedico ed odontoiatrico.

P. DISEGNO PRINCIPALE



FIRMA DEL / DEI
RICHIEDENTE / I

NOTAR BARTOLO & GERVASI spa

Lino Bighetti

FI 2004A 000048

Domanda di Brevetto per Invenzione Industriale dal titolo:

Compositi biomimetici contenenti idrossiapatiti sostituite con magnesio e carbonato e processi per ottenerli

A nome : A. MENARINI INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE Srl

Con sede in: FIRENZE

Inventori : Norberto ROVERI, Graziella BIAGINI, Anna TAMPIERI, Alessandro TOSETTI, Maria ALTAMURA, Cristina GOSO

Depositata il con il n°

Campo dell'invenzione

La presente invenzione riguarda i materiali utili per il trattamento dei difetti ossei in campo ortopedico e odontoiatrico.

Stato dell'arte

La fase inorganica costitutiva dell'osso e dei denti è stata per lungo tempo rappresentata ed idealizzata come idrossiapatite stechiometrica (HA: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Negli ultimi anni la ricerca si è focalizzata sulla sintesi di idrossiapatite non stechiometrica, contenente specifici ioni sostituenti poiché il maggior costituente del tessuto biologico è in realtà idrossiapatite variamente sostituita nei siti reticolari sia cationici che anionici. Tra i sostituenti dello ione calcio (Ca^{2+}), il Mg^{2+} risulta di notevole interesse poiché assume un'importante ruolo nel processo di sviluppo di nuovo tessuto osseo. E' stato verificato che nei tessuti calcificati la quantità di Mg presente nella fase apatitica è maggiore allo stadio iniziale del processo di calcificazione e diminuisce al progredire della mineralizzazione. Inoltre pare che il Mg possa avere un ruolo importante nelle modificazioni qualitative della matrice ossea che ne determinano la fragilità. La scarsità di Mg influisce negativamente su

tutti gli stadi del metabolismo scheletrico, causando cessazione della crescita ossea, diminuzione dell'attività di osteoblasti ed osteoclasti, osteopenia e fragilità ossea.

Gli studi di sintesi chimica di apatite parzialmente sostituita con Mg, hanno rivelato che tale ione inibisce la cristallizzazione dell'apatite in soluzione, conferendo all'apatite sintetica una bassa cristallinità che la rende anche morfologicamente più simile all'apatite naturale. Allo stesso tempo la Mg idrossiapatite sintetica risulta più solubile e quindi più riassorbibile della HA non sostituita. Esiste un limite tuttavia all'incorporamento di Mg nell'apatite, dato che alte concentrazioni di tale ione tendono a destabilizzarne la struttura. Rapporti molari Mg/Ca in soluzione superiori a 0.3 rendono proporzionalmente probabile la formazione di tricalciomagnesio fosfato a scapito della HA sostituita Mg. La sostituzione dello ione Ca con Mg può essere aumentata mediante il contemporaneo incorporamento di ioni carbonato nella struttura apatitica. Ciò risulta di estremo interesse poiché anche lo ione carbonato è presente nella struttura dell'apatite biologica; il suo incorporamento nella idrossiapatite di sintesi è quindi da considerarsi di primaria importanza. Lo ione carbonato può occupare due siti differenti nella struttura apatitica: può sostituire parzialmente lo ione OH^- (sito A) e/o lo ione PO_4^{3-} (sito B). Sia il contenuto totale di carbonato (variabile nel range 3-8 % in peso) che la quantità relativa di carbonatazione di tipo A e B (A/B variabile nel range 0.7-0.9) presente nell'apatite biologica dipendono dall'età dell'individuo. Le carbonatazioni sintetiche sono preferenzialmente da effettuarsi nel sito B, poiché in questo caso

si ottiene una diminuzione della cristallinità ed un aumento della solubilità della fase apatitica. Inoltre la carbonatazione di tipo A si riflette in una minore affinità dell'apatite per le cellule osteoblastiche dando luogo ad una minore adesione cellulare e una ridotta produzione di collagene, rispetto all'HA non sostituita.

La sintesi di Mg -carbonato-idrossiapatite (MgCHA) risulta quindi di primaria importanza nell'ambito della messa a punto di materiali sintetici che mimano sia dal punto di vista compositivo che morfologico, la fase inorganica del tessuto osseo.

Tutto questo è ben descritto nella letteratura scientifica, per esempio:

-Landi, E., Celotti, G., Logroscino, G. and Tampieri, A., Carbonated Hydroxyapatite as Bone Substitute. J. Eur. Ceram. Soc., 2003, 23, 2931-2937.

-Redey, S.A., Razzouk, S., Rey, C., Bernache-Assollant, D., Leroy, G., Nardin, M. and Cournot, G., Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite and natural calcium carbonate: relationship to surface energies. J. Biomed. Mater. Res., 1999, 45, 140-147.

-Redey, S.A., Nardin, M., Bernache-Assollant, D., Rey, C., Delannoy, P., Sedel, L. and Marie, P. J., Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: role of surface energy. J. Biomed. Mater. Res., 2000, 50, 353-364.

-Gibson, I.R. and Bonfield, W., Preparation and Characterization of Magnesium/Carbonate co-substituted Hydroxyapatites, J. Mat. Sci.: Mat Med., 2002, 13, 685-693.

- I. R. Gibson and W. Bonfield: J. Biomed. Mater. Res., vol. 59 (2002) p.697.

- A. Bigi, G. Falini, E. Foresti, M. Gazzano, A. Ripamonti and N. Roveri: J.Inorg.Biochem., vol.49 (1993) p.69-78

-S.Baravelli, A. Bigi, A. Ripamonti, E. Foresti and N. Roveri J.Inorg.Biochem., vol.20 (1984) p.1-12

-A. Bigi, A. Ripamonti, M.H.J.Koch, G.Cojazzi, G. Pizzuto and N. Roveri, Int.J. Biol. Macromol., (1991),vol.13,p.110-114

-A. Bigi, E. Foresti, R. Gregoriani, A. Ripamonti, N. Roveri and J. S. Shah " The Role of Magnesium on the Structure of Biological Apatites" Calcif Tissue Int. (1992) vol. 50, p. 439-444

-A. Bigi, G. Falini, E. Foresti, M. Gazzano, A. Ripamonti and N. Roveri Acta Cryst. (1996).B52, p. 87-92

Consideriamo che le idrossi apatiti correntemente sintetizzate presentano problemi (lento bio-riassorbimento ed inadeguata attivazione degli osteoblasti) attribuibili al fatto di essere composti stechiometricamente puri, mentre le apatiti naturali contengono ioni dopanti quali il carbonato ed il magnesio. Le carbonato idrossiapatiti appaiono essere meglio riassorbite dagli osteoclasti, e questo è probabilmente dovuto ad un incremento di solubilità dovuto alla sostituzione del carbonato al posto del fosfato. Apatiti dopate con magnesio hanno mostrato una cinetica di osteointegrazione più rapida, probabilmente dovuta all'azione stimolante del magnesio sulla crescita degli osteoblasti e sulla secrezione di proteine di matrice.

Inoltre, nelle HA sintetiche, è importante che il magnesio non sia solo adsorbito o inserito nella matrice cristallina superficialmente, in modo da evitare un suo rilascio massivo solo inizialmente..

In WO9932400 si descrive una sintesi di una idrossiapatite sostituita con carbonato e con magnesio: la quantità di Mg inglobata non è superiore al 0.5% in peso, il carbonato non supera il 1% in peso e per realizzarla si fa ricorso ad un metodo sintetico in cui il carbonato viene introdotto nella miscela di reazione senza l'ausilio di altri ioni indesiderati quali il sodio. Inoltre il rapporto Ca+Mg/P trovato è appena superiore al valore teorico per le idrossiapatiti non sostituite 1.67; e questo indica che il carbonato va a sostituire prevalentemente il gruppo idrossido sul sito A, trascurando sostanzialmente il sito B, cioè il fosfato. Con il processo descritto nella presente invenzione la percentuale di Mg introdotta è considerevolmente superiore e la sostituzione del carbonato interessa prevalentemente il sito B.

In WO03089022 si rivendicano materiali compositi costituiti da una matrice organica e da una fase inorganica minerale, in cui la fase inorganica viene adsorbita nella matrice organica in forma di liquido; nello specifico la matrice organica è in genere collagene.

In US6569489 si realizza un processo per depositare idrossiapatite direttamente su un substrato adatto per l'impianto immergendo il substrato in una soluzione acquosa liquida contenente i sali da cui si formerà l'idrossiapatite.

In JP-A-6245992 si descrive una carbonato idrossiapatite che presenta notevoli differenze rispetto a quella della presente invenzione fra cui

spicca il basso grado di sostituzione in Mg (fra lo 0.05 e lo 0.5% in peso con un rapporto $(Ca+Mg)/P$ fra 1.50 e 1.67).

Da quanto sopra è evidente la necessità di preparare nuovi materiali contenenti idrossi apatiti con sempre migliori caratteristiche che li avvicinino sempre più al prodotto naturale, ma permettendo nel contempo, per motivi di sicurezza, un uso di materiale non di origine animale.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

E' stato ora sorprendentemente trovato che è possibile realizzare una idrossiapatite carbonatata contenente magnesio (MgCHA) in una forma a basso grado di cristallinità, adatta per realizzare un materiale composito costituito da detta idrossiapatite ed un polimero organico, preferibilmente un alginato, in forma di un granulato liofilizzato, adatto per impianti ossei, in particolare in campo odontoiatrico.

Fanno parte quindi della presente invenzione sia la MgCHA, con una nanostruttura a basso grado di cristallinità, sia il materiale composito finale in forma di granulato come pure i processi per la loro preparazione.

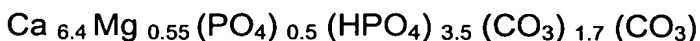
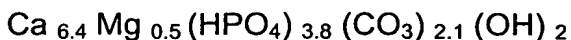
Il metodo sintetico utilizzato, secondo l'invenzione, per la sintesi della MgCHA permette un'introduzione selettiva del carbonato nelle posizioni più favorevoli (sito B, al posto del fosfato) ed un notevole arricchimento in ioni magnesio. Il carbonato può infatti entrare nella struttura della idrossiapatite in due siti, può cioè sostituire un gruppo OH (sito A) oppure può sostituire un gruppo fosfato (sito B). La sostituzione sul sito

B è in generale preferibile poiché impartisce al composto una maggiore solubilità nell'ambiente biologico.

Il metodo sintetico impiegato ci permette di ottenere idrossiapatiti sostituite con carbonato fra il 4 e l'10% in peso, preferibilmente fra il 6 e l'8% in peso, con una distribuzione fra i due siti che va per il sito A fra il 40 ed il 45% e conseguentemente per il sito B fra il 55 ed il 60%.

Con lo stesso processo si riesce a dopare la carbonato idrossiapatite in modo omogeneo con magnesio ottenendo una concentrazione di Mg compresa fra il 5 ed il 15% (espressa come percentuale molare rispetto al calcio), preferibilmente fra il 6 e 8%; oppure, esprimendolo come percentuale in peso, ad una quantità di Mg fra il 1.0 ed il 2.72%, preferibilmente dal 1.19 al 1.57% in peso. L'introduzione del Mg determina un parziale collasso della struttura cristallina dell'idrossiapatite, ma mediante analisi RX è possibile constatare la persistenza delle bande caratteristiche di questo tipo di struttura per cui possiamo affermare che il prodotto ottenuto è pur sempre una idrossiapatite anche se a livello nanostrutturale presenta un basso grado di cristallinità, stimabile intorno al 40-60%. L'indice di cristallinità può essere determinato dall'analisi della diffrazione RX p.e. secondo quanto descritto in : Landi, E, Tampieri A, Celotti G, Sprio S; J. Eur . Ceram. Soc. 2000, 20, 2377-2387. Il rapporto molare (Ca+Mg)/P nei composti ottenuti è risultato superiore a 1.7, superiore al valore di 1.67 delle idrossiapatiti non sostituite, e questo appunto indica che la sostituzione del carbonato è avvenuta prevalentemente sul sito B. Il materiale ottenuto è comunque omogeneo e, a titolo puramente

descrittivo, può essere rappresentato come un composto intermedio fra le due seguenti formule limite, supponendo di mantenere costante il rapporto Mg/Ca:



In cui la formula 1 indicherebbe un composto in cui sono stati sostituiti con carbonato tutti i siti B sostituibili e la formula 2 un composto in cui sono stati sostituiti con carbonato tutti i siti A sostituibili.

Rappresentazioni analoghe possono essere fatte per altri composti con un variato rapporto Mg/Ca. La MgCHA viene poi miscelata opportunamente con un polimero organico che ha un duplice effetto: agisce come modulatore dell'interazione dell'apatite con l'ambiente biologico ed inoltre permette una buona lavorabilità del composito in vista delle sue applicazioni mediche. Il polimero organico impiegato di preferenza è un polisaccaride e nello specifico trattasi di un alginato. Gli alginati sono una famiglia di polisaccaridi lineari di origine naturale (alghe) costituiti da acido D-mannuronico (M) e acido L-guluronico (G) presenti, a seconda della fonte, in blocchi di residui simili, cioè del tipo MMMMMM, GGGGGG o rigorosamente alternati, cioè GMGMGMGM. La composizione fra i due può variare in percentuali che vanno dal 20 al 80% per M e conseguentemente dall'80 al 20% per G. Specificamente è stato impiegato alginato di sodio commerciale: per esempio alginato LF 120M B.H. Schilling (G/M 40/60), alginato LF10/60 B.H. Schilling (G/M, 70/30), alginato Fluka (G/M circa 70/30).

Il composito della presente invenzione è costituito da una miscela di MgCHA e alginato in proporzioni che vanno dal 50:50 al 80:20 fra loro, preferibilmente in rapporto di 60 : 40.

I compositi di cui sopra sono preferibilmente ottenuti in forma granulare porosa per facilitare la conversione in forma di pasta viscosa mediante trattamento con soluzioni acquose.

Le dimensioni del granulato (la granulometria) possono essere agevolmente variate durante il processo produttivo in relazione alle esigenze applicative del composito

Il materiale composito presenta pertanto le seguenti caratteristiche:

- osteoconduttività e osteoinduttività, dovute all'incremento dell'adesività e della crescita degli osteoblasti indotta dal magnesio;
- biorassorbimento, indotto dai cambiamenti favorevoli nella cristallinità (pur mantenendo le specifiche delle idrossi apatiti), solubilità, granulometria indotti dal carbonato e/o magnesio e/o polimero;
- lavorabilità, dovuta alle proprietà gelificanti del polimero;
- sicurezza, poiché niente è di origine animale.

Il materiale composito descritto può essere preparato agevolmente, secondo metodi noti nello stato dell'arte, in forme finali diverse da quella di granulato poroso; per esempio come gel, pasta malleabile, stucco malleabile, spugna, particolato o solido preformato modellabile in base alle esigenze applicative.

Detto materiale può essere irraggiato con radiazioni gamma per sterilizzarlo opportunamente.

Il composito, al momento dell'uso, può essere applicato nella quantità necessaria dopo essere stato miscelato opportunamente con una soluzione acquosa. Tale soluzione può essere scelta per esempio nel gruppo: acqua sterile, soluzione salina sterile o soluzione tampone fosfato PBS, sangue o suoi derivati (tipo gel piastrinici, plasma etc.), al fine di ottenere una pasta gelatinosa consistente ma facilmente lavorabile.

L'idrossiapatite oggetto della presente invenzione può essere realizzata mediante un processo sintetico come di seguito descritto.

Una soluzione di acido fosforico ed una di bicarbonato di sodio vengono aggiunte, contemporaneamente, in un periodo di 2-8 ore , preferibilmente in 3-5 h, ad una sospensione di calcio idrossido ed un sale di magnesio, preferibilmente magnesio cloruro esaidrato, mantenendo la temperatura fra i 30° ed i 60°C, preferibilmente fra 35° e 45°C. Terminata l'aggiunta si mantiene sotto agitazione per 1-6 ore e poi a riposo a temperatura ambiente per 10-48h, preferibilmente per 20-28h. Si filtra l'idrossiapatite per centrifugazione o filtrazione, si lava con acqua e si essicca.

La MgCHA così ottenuta viene miscelata con alginato di sodio, entrambi come polveri setacciate, in rapporti da 50:50 a 80:20, preferibilmente in rapporto 60:40 in un miscelatore. Si aggiunge un solvente organico, preferibilmente alcool etilico o etere etilico, per permettere una compenetrazione più intima, mescolando continuamente. La successiva rimozione del solvente prima in stufa

rapidamente e poi mediante freeze-drying per tempi lunghi (24-48h) permette di ottenere il materiale composito granulato finale.

Analoghi processi di granulazione in presenza di acqua o solventi acquosi portano a composti di scarsa stabilità; il metodo di granulazione con un solvente alcolico o etero porta invece, a seguito di completa evaporazione a bassa temperatura, ad un granulato stabile, conservabile a temperatura ambiente.

I composti oggetto della presente invenzione possono essere impiegati per il trattamento di pazienti con perdita di sostanza ossea, tramite applicazione del composito a livello del difetto osseo. Il composito può essere applicato nella quantità necessaria dopo essere stato miscelato, immediatamente prima dell'uso, con acqua sterile, soluzione salina sterile o simili oppure con sangue prelevato dal paziente stesso, al fine di ottenere una pasta gelatinosa consistente ma facilmente lavorabile. Il difetto osseo può essere indotto chirurgicamente o può verificarsi naturalmente in seguito a trauma o malattia. Il composito può essere utilizzato sia in campo odontoiatrico che ortopedico. Possibili applicazioni in campo odontoiatrico sono, ad esempio, le seguenti condizioni: aumento/ricostruzione degli alveoli dentali, riempimento dei difetti dopo resezioni degli apici delle radici, cistectomia, asportazione chirurgica dei denti inclusi, riempimento degli alveoli dopo estrazione dentaria per mantenere la cresta, preparazione del letto per l'impianto, stabilizzazione di impianti immediati, deiscenze dell'osso. In campo ortopedico il composito può essere utilizzato ad esempio nella chirurgia

maxillofacciale, nella ricostruzione delle articolazioni, nel riparo delle fratture, nelle procedure ortopediche chirurgiche, nelle fusioni spinali.

Il composito può essere utilizzato in associazione con uno o più agenti attivi biologicamente. Detti agenti attivi biologicamente sono selezionati nel gruppo : vitamine, supplementi minerali, modulatori della funzionalità degli osteoblasti o degli osteoclasti, antimicrobici, antifungini, antibatterici, antivirali, anti-parassitari, fattori di crescita, fattori angiogenici, anestetici, mucopolisaccaridi, cellule, proteine, enzimi, peptidi.

Detti agenti antimicrobici sono scelti fra: isoniazide, ethambutol, pirazinamide, streptomina, clofazimina, rifabutina, fluoroquinolone, ofloxacina, doxyciclina, ampicillina, amfotericina B, ketoconazolo, fluconazolo, pirimetamina, sulfadiazina, clindamicina, lincomicina, pentamidina, atovaquone, paromomicina, diclarazarile, aciclovir, brivudine, trifluorouridina, foscarnet, penicillina, gentamicina, ganciclovir, iatroconazolo, miconazolo, Zn-piritione, e sali di argento.

Detti fattori di crescita sono scelti fra: basic bone GF, fibroblast GF, acidic fibroblast GF, nerve growth GF, epidermal GF, insulin-like GF 1 e 2, platelet-derived GF, skeletal GF, tumor angiogenesis GF, vascular endothelial GF alfa e beta, interleukina-8, granulocyte-macrophage colony stimulating factor, interleukina, interferon.

Detti mucopolisaccaridi sono scelti nel gruppo : eparina, eparin solfato, eparinoidi, dermatan solfato, pentosan polisolfato, condroitin solfato, acido ialuronico, cellulosa agarosio, chitina, destrano, carragenina.

Dette proteine sono scelte fra: collagene, fibronectina, laminina, elastina, osteopontina, osteonectina, sialoproteina dell'osso, alfa-2HS-glicoproteina, Gla-proteina ossea, Gla-proteina della matrice, fosfoglicoproteina ossea, fosfoproteina ossea, proteoglicano osseo, protolipidi, proteina morfogenetica ossea, fattore di induzione cartilagineo, proteine associate con la cartilagine, proteine associate con la dentina, proteine associate con lo smalto.

Dette cellule sono scelte nel gruppo: staminali del midollo osseo, osteoblasti, osteoclasti, osteociti, del sangue, epiteliali, odontoblasti, ameloblasti, cementoblasti, e neuronali.

Le composizioni realizzate con il composito oggetto della presente invenzione, possono essere impiegate anche con impianti di diversa natura.

Qui di seguito vengono riportati alcuni esempi di realizzazione dell'invenzione come precedentemente descritta.

Esempio 1

Preparazione della MgCHA.

In un pallone da 2 litri si prepara a temperatura ambiente una soluzione acquosa 0.3 M di $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (48.4 g in 800 ml d'acqua). Nella stessa soluzione si disperdono 100 g di $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

La sospensione risultante, mantenuta sotto costante agitazione con un agitatore meccanico, è portata alla temperatura di $40^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$.

Raggiunta la temperatura desiderata, si aggiungono contemporaneamente goccia a goccia una soluzione acquosa 1.3 M di H_3PO_4 (88.8 g in 600 ml d'acqua) e una soluzione acquosa 0.8 M di

NaHCO_3 (12.9 g in 200 ml d'acqua), regolando le velocità di aggiunta in modo che sia completa in 4 h, mantenendo sempre costanti agitazione e temperatura.

Al termine del gocciolamento, si lascia in agitazione per altre 2 h, mantenendo la temperatura ai $40^\circ\text{C} + 5^\circ\text{C}$ e poi si lascia a riposo per 24 h lasciando tornare a temperatura ambiente. Trascorse le 24 h, si elimina il surnatante e si separa il prodotto dal liquido residuo per centrifugazione.

L'idrossiapatite ottenuta è poi sottoposta a 3 lavaggi con acqua per dispersione (utilizzando un agitatore magnetico) e a centrifugazione.

La polvere è seccata per 12 h in stufa alla temperatura di 80°C in aria e conservata a temperatura ambiente in recipiente chiuso. Resa: 120-140 g.

Caratterizzazione del composto ottenuto:

Aspetto: polvere bianca

Spettrometria di emissione al plasma (ICP-AES): Ca: 31.81%, Mg: 1.57%, P: 14.86% in peso (rapporto molare $(\text{Ca}+\text{Mg})/\text{P}$ pari a 1.79). La quantità di Mg risulta quindi pari al 8.1 % espresso come percentuale molare rispetto al calcio.

Diffrazione a raggi X: (v. Fig. 1): lo spettro di diffrazione ai raggi X ci consente di osservare i segnali caratteristici delle apatiti ed avere informazioni sulla variazione di alcuni parametri di cella (in particolare gli assi (a) e (c)) che indicano la presenza sia di ioni Mg^{2+} (in sostituzione a ioni Ca^{2+}), che di ioni CO_3^{2-} all'interno della struttura cristallina dell'apatite.

Dallo spettro si evince infatti che:

- l'asse (a) della cella subisce una riduzione di 1,18% rispetto a quello dell'apatite;
- l'asse (b) della cella subisce una riduzione di 0,81% rispetto a quello dell'apatite

La presenza di ioni Mg^{2+} in sostituzione a ioni Ca^{2+} all'interno della struttura dell'apatite, porta ad una diminuzione di entrambi i valori degli assi a e c della cella cristallina e questo come conseguenza di un minore raggio ionico del Mg^{2+} .

Per quanto riguarda il gruppo CO_3^{2-} , la sua presenza porta alla diminuzione dell'asse a e l'aumento dell'asse c nel caso di sostituzione in posizione fosfatica (sito B). In caso di sostituzione ossidrilica (sito A), le variazioni sono di segno opposto e diversa entità.

Pertanto i valori degli assi che noi calcoliamo sono il risultato dell'influenza di più sostituenti che hanno effetti sinergici ed opposti sui sopracitati valori degli assi.

Accoppiando la diffrazione X con l'analisi FTIR e TG è possibile quantizzare l'entità di ogni differente e singola sostituzione.

Spettroscopia IR (v. Fig. 2) : Lo spettro FTIR presenta i segnali relativi ai gruppi PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , OH^- e CO_3^{2-} .

Il segnale a 874 cm^{-1} tipico del gruppo CO_3^{2-} dà informazioni sul tipo di carbonatazione dell'apatite. Dall'analisi di deconvoluzione del picco del carbonato è possibile dedurre che la carbonatazione della polvere è prevalentemente di tipo B con un rapporto $A/B \approx 0.75$ (circa 57% B e 43% A).

Analisi termogravimetrica (TG-DTA): (v. Fig. 3) Dati qualitativi e quantitativi sul prodotto si ottengono dall'analisi termica. Si osserva una prima diminuzione di peso alle basse temperature, dovuta principalmente alla perdita d'acqua e CO₂ adsorbite sulla superficie del campione ed acqua occlusa nella struttura. A circa 600-700°C, una seconda perdita di peso è attribuibile al processo di decarbonatazione e per temperature superiori a circa 900°C, subentra il processo di deidrossilazione.

Dall'analisi risulta che il contenuto totale di carbonato della polvere è di circa 6wt%; tale analisi non ci permette di discriminare tra le posizioni A e B.

La reazione ha mostrato una ottima riproducibilità ottenendo nelle varie prove prodotti con caratteristiche assolutamente comparabili e con un rapporto molare (Ca+Mg)/P = 1.79 ± 0.07

Esempio 2

Si ripete la preparazione descritta nell'esempio 1 utilizzando una minore quantità di sale di Magnesio, pari a 42.35 g di MgCl₂ esaidrato sciolto in 800ml (0.26M).

Si ottiene così un composto assolutamente simile a quello descritto in esempio 1 che presenta i seguenti valori nella ICP: Ca: 32.02%, Mg: 1.33%, P: 14.91% in peso (rapporto molare (Ca+ Mg)/P pari a 1.77). La quantità di Mg risulta quindi pari al 6.8% espresso come percentuale molare rispetto al calcio.

Gli altri parametri di caratterizzazione sono sovrapponibili a quelli ottenuti per il composto dell'esempio 1.

Esempio 3

Si ripete la preparazione descritta nell'esempio 1 utilizzando una minore quantità di sale di Magnesio, pari a 360.25g di $MgCl_2$ esaidrato sciolto in 800ml (0.22M).

Si ottiene così un composto assolutamente simile a quello descritto in esempio 1 che presenta i seguenti valori nella ICP: Ca: 32.21%, Mg: 1.20%, P: 14.94% in peso (rapporto molare (Ca+Mg)/P pari a 1.77). La quantità di Mg risulta quindi pari al 6.1% espresso come percentuale molare rispetto al calcio.

Gli altri parametri di caratterizzazione sono sovrapponibili a quelli ottenuti per il composto dell'esempio 1.

Esempio 4

Preparazione del composito

La polvere di MgCHA, ottenuta nell'esempio 1, viene setacciata fino a 150 μm . 50 g di una miscela di polveri carbonato magnesio apatite e alginato di sodio (Protanal LF 10/60 B.H. Schilling) in rapporto in peso 60/40 vengono poste in un miscelatore. Le polveri vengono omogeneizzate inizialmente a secco per circa 10 sec.

Si aggiungono 10 ml di alcool etilico assoluto e si aziona il miscelatore per circa 20 secondi. Si arresta il mescolamento e con una spatola si rimuove il preparato eventualmente rimasto sulle pareti e sulle lame. Tale procedura è ripetuta 6-8 volte fino ad aggiungere complessivamente 40 ml di alcol.

Il composito ottenuto viene seccato in stufa a 60 °C per 10 minuti e il solvente residuo eliminato tramite evaporazione con un processo freeze-drying a -45°C per 24 h.

Caratterizzazione del composto ottenuto:

Aspetto: polvere granulare porosa.

Analisi ICP: l'alginato commerciale utilizzato ha un contenuto di calcio dichiarato < 1.5%. La presenza di questo calcio ha effetto sul valore trovato del rapporto molare Ca+Mg/P che risulta di 1.82 ± 0.07 .

Diffrazione a raggi X (v. Fig. 4) L'analisi diffrattometrica RX conferma che la fase inorganica non è stata compromessa durante il processo di granulazione con alginato, come si evidenzia dalla presenza delle bande caratteristiche per valori di 2-Theta compresi fra 25 e 40.

Spettroscopia IR:(v. Fig. 5) anche la spettroscopia infrarossa mostra come predominante il profilo caratteristico della magnesio carbonato idrossi apatite che risulta praticamente sovrapponibile a quello ottenuto prima del trattamento con alginato (v. Fig 2).

Analisi termogravimetrica (TG-DTA): (v. Fig. 6) I profili ottenuti dal trattamento termico mostrano le diminuzioni di peso relative alla decomposizione di entrambe le fasi, organica ed inorganica.

Alle basse temperature fino a 500°- 550°C si ha perdita di CO₂ e acqua adsorbite sul granulato e di acqua occlusa nelle struttture dell'apatite e del l'alginato; intorno a 600°C si ha la decomposizione dell'alginato; fra 600° e 650°C e fra 800° e 900°C si ha la

decarbonatazione dell'apatite e la combustione dei residui organici; infine sempre intorno agli 800°C si ha la deidrossilazione.

Il composito ottenuto mostra:

- stabilità della componente inorganica dopo la formazione del composito e
- stabilità in peso del granulato finale alle variazioni di umidità ambientali.

Il materiale composito presenta un contenuto residuo di acqua inferiore al 5% in peso.

Mediante settacciamento si può isolare una frazione con granulometria compresa fra 250 e 500 micron.

Esempio 5

Preparazione del composito per via umida (il presente esempio non fornisce un materiale composito finale accettabile ai fini della presente invenzione)

50 g di una miscela di polveri di carbonato magnesio idrossiapatite, ottenuta nell'esempio 1, e alginato di sodio in rapporto in peso 60/40 vengono poste in un miscelatore e trattate come in esempio 4 utilizzando però acqua al posto dell'alcool etilico. Il granulato finale viene seccato in stufa a 60°C per 30min e poi in essiccatore su letto di silice a temp. ambiente.

Dall'analisi ai raggi X si nota una profonda alterazione della componente inorganica. Viene osservata anche una variazione continua nel tempo in peso del granulato per assorbimento di umidità dall'ambiente.

Attività farmacologica

Il composto descritto in esempio 4 è biocompatibile, cioè il materiale, una volta impiantato nell'ospite, non induce risposte patogene di tipo infiammatorio o di necrosi tissutale. La biocompatibilità del prodotto è stata valutata tramite studi in vitro e in vivo. In particolare, per verificare la risposta biologica cellulare nei confronti del composito selezionato, sono stati effettuati studi in vitro allo scopo di evidenziare eventuali effetti derivanti dal contatto diretto o indiretto del materiale in esame con linee cellulari di diversa origine, a seguito di esposizioni di breve e media durata. I risultati ottenuti dimostrano che il prodotto non è citotossico. Studi in vivo hanno dimostrato che il preparato non induce reazioni cutanee di sensibilizzazione, supportando così ulteriormente la buona biocompatibilità del prodotto.

Il prodotto descritto è efficace nel riparare un difetto osseo, a seguito di applicazione della quantità necessaria del prodotto a livello della cavità esistente nell'osso. Ad esempio, è stata valutata la capacità del prodotto in esame di riparare nel coniglio un difetto osseo (perdita di sostanza) indotto a livello dei condili laterali del femore. Le valutazioni effettuate hanno dimostrato che il prodotto non induce reazioni infiammatorie o necrosi tissutale significativamente diverse dal controllo. Inoltre il prodotto ha dimostrato ottime proprietà osteoconduttive, tempi di riassorbimento adeguati all'utilizzo previsto e capacità di velocizzare la risposta fisiologica di riparazione endogena ossea.

Rivendicazioni

1. Magnesio carbonato idrossiapatiti (MgCHA) in cui la percentuale di carbonatazione è compresa tra il 4% e il 10% in peso, e contenenti magnesio in percentuale dal 5% al 15%, espresso come percentuale molare rispetto al calcio.
2. MgCHA, secondo la rivendicazione 1, in cui il magnesio è contenuto in percentuale molare rispetto al calcio compresa tra il 6% e 8%.
3. MgCHA secondo la rivendicazione 2, in cui il carbonato è distribuito in ragione dal 40% al 45% nel sito A e dal 60% al 55% nel sito B.
4. MgCHA secondo le rivendicazioni 1-3 caratterizzate da una nanostruttura a basso grado di cristallinità, in cui il grado di cristallinità è compreso fra il 40% e il 60%
5. Un composito costituito da una idrossiapatite insieme ad un polimero organico, caratterizzato dal fatto che l'idrossiapatite è una MgCHA, secondo le rivendicazioni 1-4, il polimero è un polisaccaride naturale e questi componenti vengono miscelati secondo un metodo che permetta di mantenere la MgCHA in forma solida.
6. Composito secondo la rivendicazione 5 in cui il polisaccaride è un alginato sodico
7. Composito secondo le rivendicazioni 1-6 in cui la MgCHA e alginato sono presenti in rapporto da 50:50 a 80:20.
8. Composito secondo la rivendicazione 7 in cui il rapporto tra la MgCHA e alginato è 60:40.

9. Composito secondo la rivendicazione 5-8 ottenuto in forma granulare porosa, facilmente convertibile, al momento dell'impiego terapeutico, in forma di pasta viscosa mediante trattamento con soluzioni acquose.

10. Composito secondo le rivendicazioni 5-8 ottenuto in una forma scelta fra: gel, pasta malleabile, stucco malleabile, spugna, particolato o solido preformato modellabile in base alle esigenze applicative..

11. Processo per la sintesi di MgCHA secondo la rivendicazione 1-4, in cui:

- a) una soluzione di acido fosforico ed una di bicarbonato di sodio vengono aggiunti contemporaneamente in un tempo compreso fra 2 e 8 ore ad una sospensione di calcio idrossido e di un sale di magnesio in acqua, ad una temperatura compresa tra 40° e 60°C,
- b) la miscela risultante viene mantenuta sotto agitazione per un tempo compreso tra 1 e 6 ore ad una temperatura compresa tra 30° e 60°C e successivamente lasciata in riposo a temperatura ambiente per un tempo compreso fra 10 e 48 ore.
- c) la MgCHA viene separata per centrifugazione o filtrazione, lavata e seccata in stufa

12. Processo di sintesi secondo la rivendicazione 10 in cui il sale di magnesio è magnesio cloruro esaidrato.

13) Processo di sintesi secondo la rivendicazione 10 in cui acido fosforico e bicarbonato di sodio vengono aggiunti in un tempo compreso fra 3 e 5 ore.

14) Processo di sintesi secondo la rivendicazione 10 in cui la temperatura di reazione è compresa fra 35° e 45°.

15) Processo di sintesi secondo la rivendicazione 5 in cui la miscela è lasciata in riposo a temperatura ambiente per un tempo compreso fra 20 e 28 ore.

16) Processo per la preparazione di compositi secondo le rivendicazioni 5-8, in forma granulare porosa, caratterizzato dalla miscelazione inizialmente a secco di polveri di MgCHA e polimero polisaccaridico, in proporzioni relative da 50:50 a 80:20, preferibilmente 60:40, e successivamente dalla miscelazione in presenza di un solvente alcolico o etero e dalla evaporazione completa del solvente.

17) Processo secondo la rivendicazione 16 in cui il solvente è alcol etilico o etere etilico.

18) Composizioni contenenti un materiale composito, secondo la rivendicazione 5.

19) Composizioni, secondo la rivendicazione 18, in cui detto composito è in forma di granulato poroso che può essere, prima dell'uso terapeutico, trasformato in una pasta gelatinosa consistente, ma facilmente lavorabile, mediante trattamento con una soluzione acquosa.

20) Composizioni, secondo la rivendicazione 18, per il trattamento di pazienti con perdita di sostanza ossea, tramite applicazione del composito a livello del difetto osseo.

21) Composizioni, secondo la rivendicazione 20, in cui il difetto osseo può essere in campo ortopedico o odontoiatrico e può essere indotto chirurgicamente o può verificarsi naturalmente in seguito a trauma o malattia.

22) Composizioni, secondo la rivendicazione 21, in cui il difetto osseo da trattare è in relazione ad un trattamento odontoiatrico scelto fra: aumento/ricostruzione degli alveoli dentali, riempimento dei difetti dopo resezioni degli apici delle radici, cistectomia, asportazione chirurgica dei denti inclusi, riempimento degli alveoli dopo estrazione dentaria per mantenere la cresta, preparazione del letto per l'impianto, stabilizzazione di impianti immediati, deiscenze dell'osso.

23) Composizioni, secondo la rivendicazione 21, in cui il difetto osseo da trattare è in relazione ad un trattamento ortopedico scelto fra: chirurgia maxillofacciale, ricostruzione delle articolazioni, riparazione delle fratture, procedure ortopediche chirurgiche, fusioni spinali.

24) Composizioni, secondo la rivendicazione 18, contenenti in associazione al composito, anche uno o più agenti attivi biologicamente.

25) Uso di compositi secondo la rivendicazione 5, per la preparazione di composizioni per il trattamento di difetti ossei nel campo odontoiatrico scelti nel gruppo costituito da: aumento/ricostruzione degli alveoli dentali, riempimento dei difetti dopo resezioni degli apici delle radici, cistectomia, asportazione chirurgica dei denti inclusi, riempimento degli alveoli dopo estrazione dentaria per mantenere la cresta, preparazione del letto per l'impianto, stabilizzazione di impianti immediati, deiscenze dell'osso.

26) Uso di compositi secondo la rivendicazione 5, per la preparazione di composizioni per il trattamento di difetti ossei nel campo ortopedico scelti nel gruppo costituito da: chirurgia maxillofacciale, ricostruzione

delle articolazioni, riparazione delle fratture, procedure ortopediche chirurgiche, fusioni spinali.

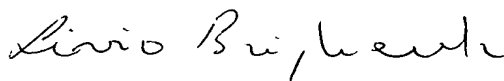
27) Uso di compositi, secondo la rivendicazione 5, per la preparazione di composizioni da impiegarsi in associazione con uno o più agenti attivi biologicamente.

28) Uso di compositi, secondo la rivendicazione 5, per la preparazione di composizioni da impiegarsi insieme ad impianti di diversa natura.

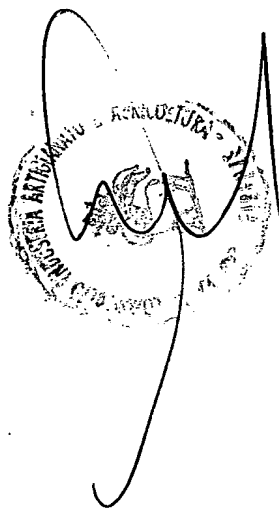
Firenze, 20 Febbraio 2004

p. A. MENARINI INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE Srl

Il Mandatario



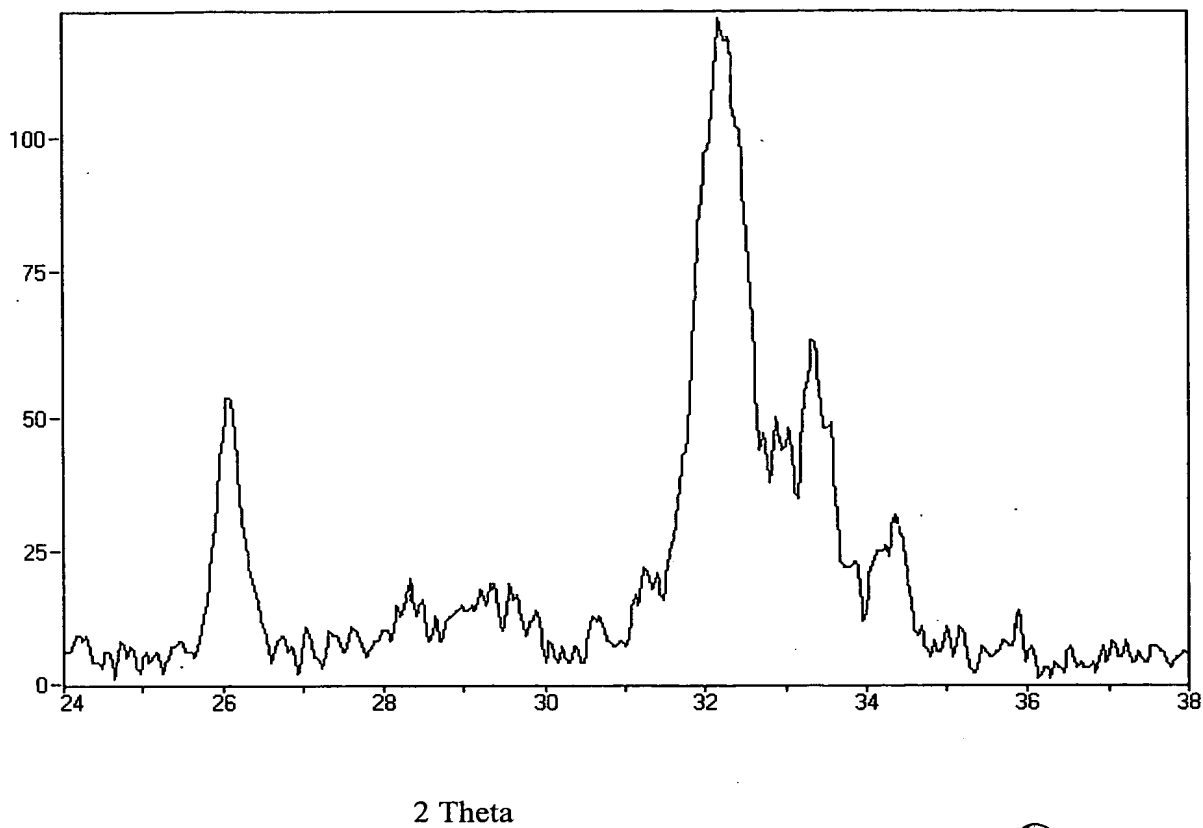
Dr. Livio Brighenti della NOTARBARTOLO & GERVASI SpA



Lino Bartolo

Fig. 1

FI 2004A 000048

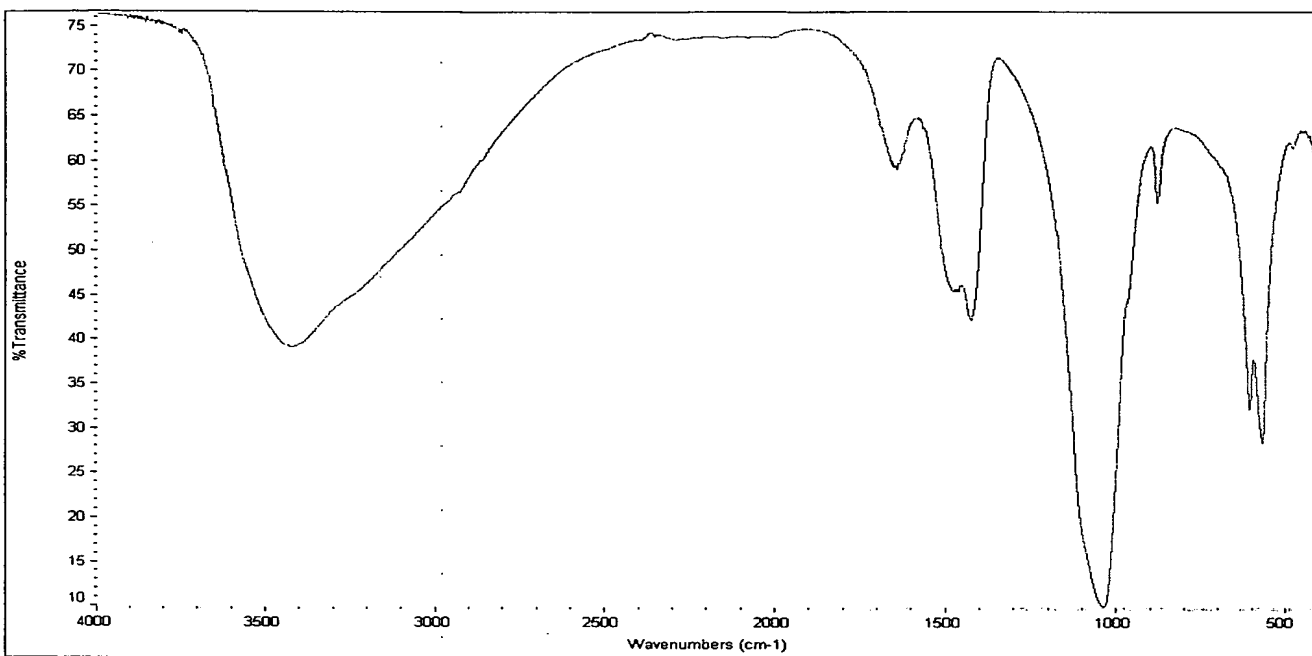


NOTAIO LINO BARTOLO
C.A. 000048

H 2004A 000048

Lino Bignardi

Fig. 2

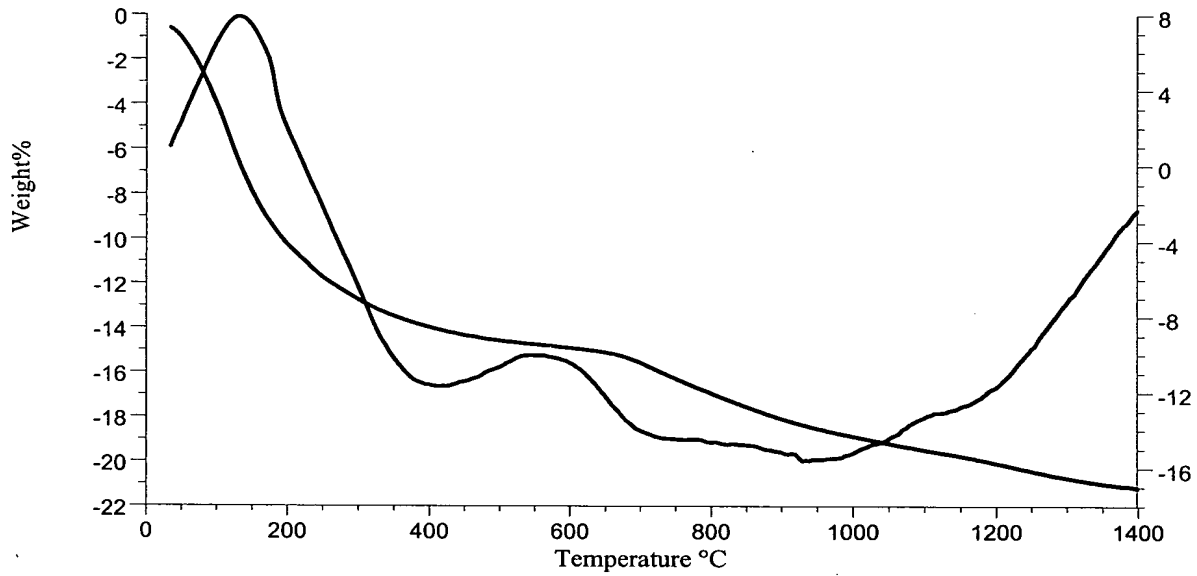


Handwritten signature and a circular stamp. The stamp contains the text "NOTAIO COMMERCIALE" and "NOTAIO PUBBLICO".

Fig. 3

H 2004A 000048

Linea Bughent

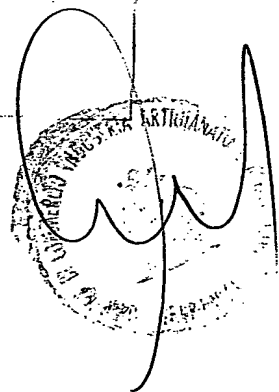
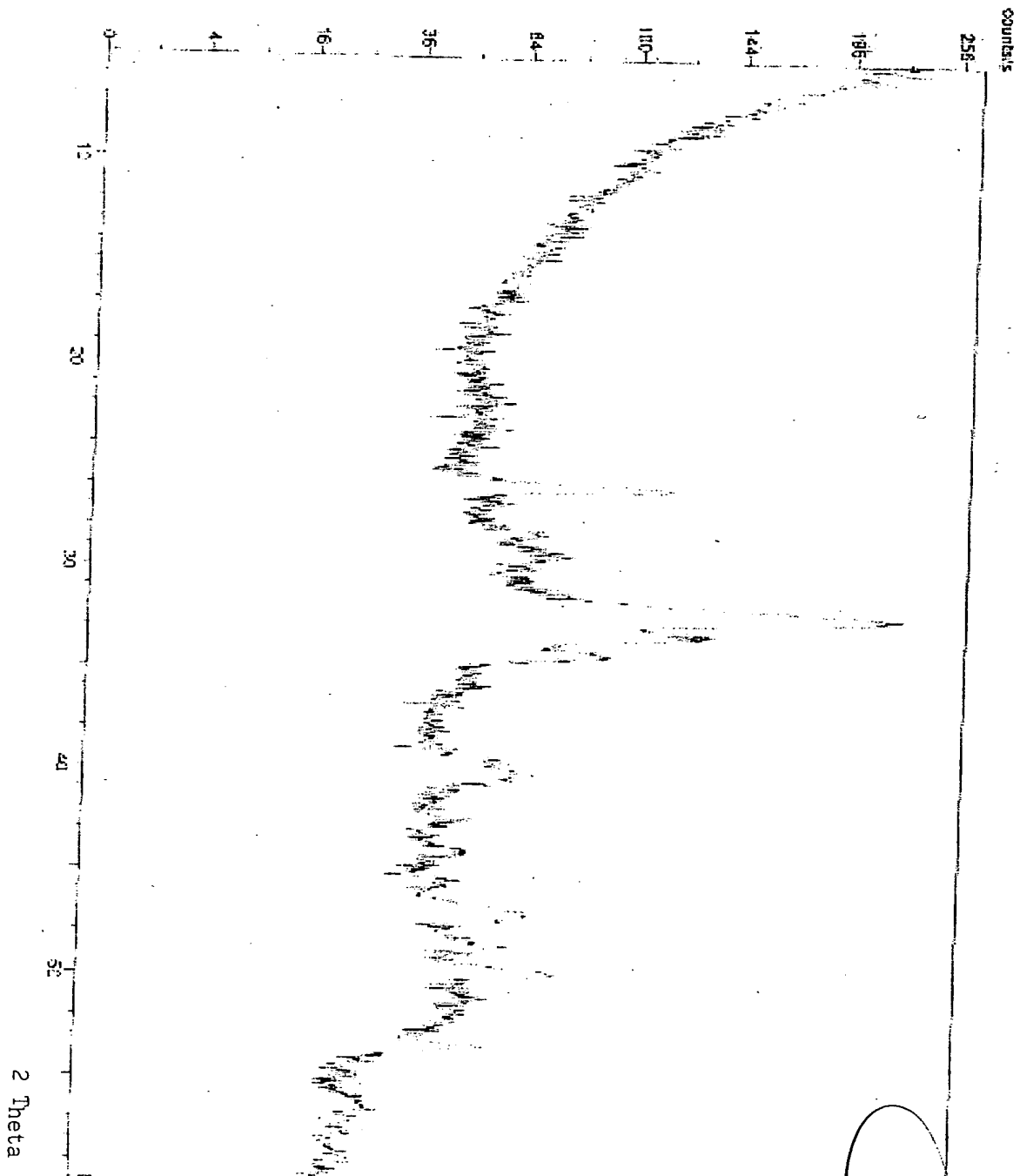


NOTA BARTOLO & GERVASI SPA
FIRMA

Luigi B. Benti

Fig. 4

FI 2004A 000048

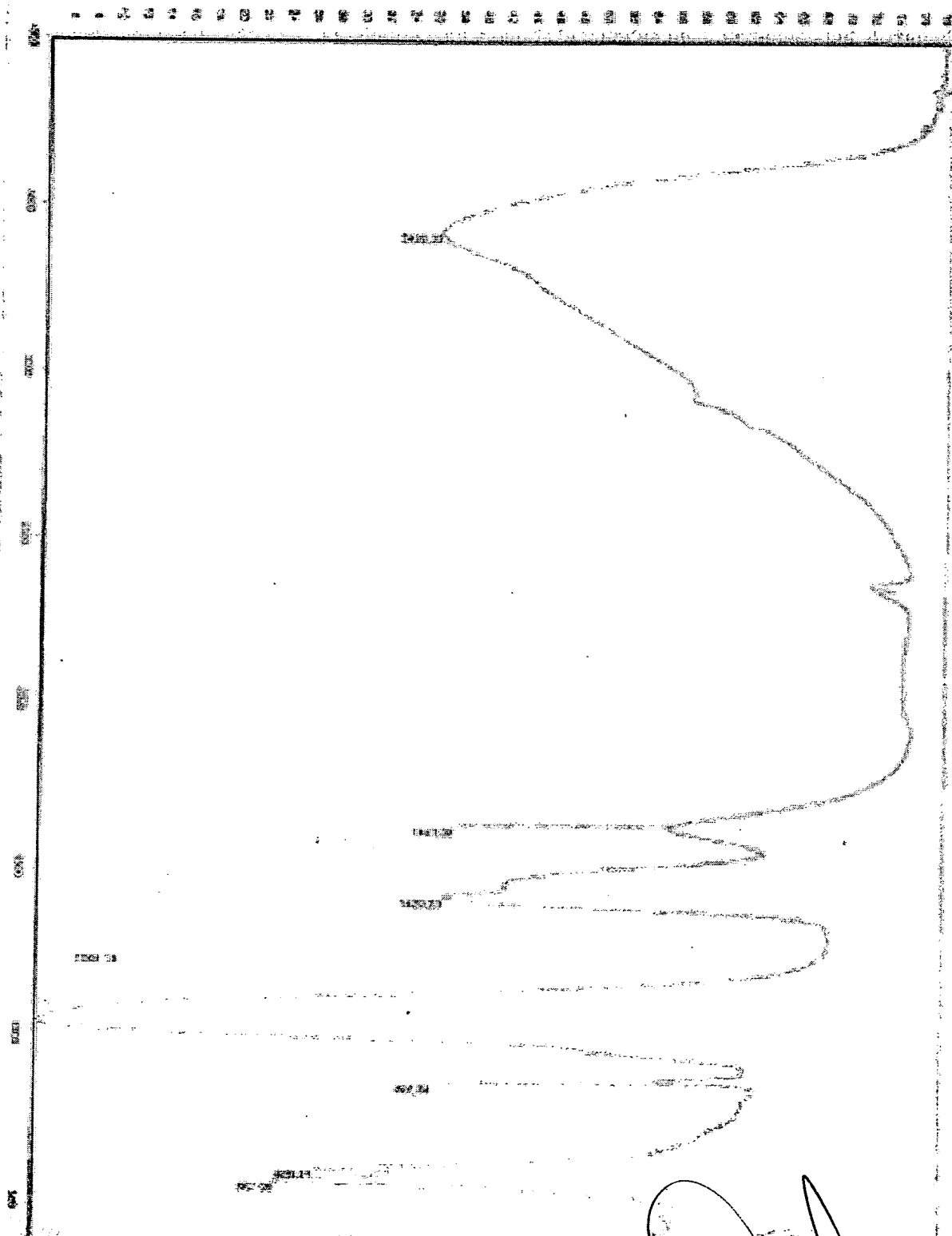


Lino Bigliardi

FIG. 5

% Transmittance

FI 2004A 000048

Wave numbers (cm⁻¹)

Stamp: *NOTAR BARTOLO & GERVA SI SPA*
Signature: *[Handwritten Signature]*

Lino Ruffini

Fig. 6

FI 2004A 000048

